



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU
DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO
EM MEDICINA**

DAVID TAVARES TEIXEIRA DA SILVA

***GENÉTICA DA PERTURBAÇÃO DE HIPERACTIVIDADE
E DÉFICE DE ATENÇÃO: GENE SNAP-25***

ARTIGO CIENTÍFICO

ÁREA CIENTÍFICA DE GENÉTICA CLÍNICA E MOLECULAR

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:
PROFESSORA DOUTORA ALDA CARDOSO**

FEVEREIRO 2014



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

GENÉTICA DA PERTURBAÇÃO DE HIPERACTIVIDADE E DÉFICE DE ATENÇÃO: GENE SNAP-25

ARTIGO CIENTÍFICO

David Silva^{1,2}, Alda Cardoso^{1,2,3}

¹ Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

² Unidade de Genética Clínica e Molecular da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal, Portugal

³ IBILI, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

E-mail: davidttsilva@gmail.com

Índice

Lista de Siglas/Abreviaturas	3
Resumo	4
Abstract	5
Introdução	6
Materiais e Métodos	8
Resultados e Discussão	11
Conclusão	15
Agradecimentos	15
Referências Bibliográficas	17

Lista de Siglas/Abreviaturas

3'UTR	<i>3' UnTranslated Region</i>
ADHD	<i>Attention Deficit and Hyperactivity Disorder</i>
Alelo C	Alelo Citosina
Alelo G	Alelo Guanina
Alelo T	Alelo Timina
DBH	Dopamina Beta Hidroxilase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
DRD4	Recetor de dopamine D4
DSM-IV-TR	<i>Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders IV, Text Revision</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GT	Genótipo Guanina-Citosina
HRR	<i>Haplotype Relative Risk</i>
NTr	Não-transmitidos
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PHDA	Perturbação da Hiperactividade e Défice de Atenção
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SNAP-25	<i>SyNaptosomal-Associated Protein of 25 kDa</i>
SNARE	<i>N-ethylmaleimide-Sensitive factor Attachment protein Receptor</i>
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>
TC	Genótipo Timina-Guanina
TDT	<i>Transmission Disequilibrium Test</i>
Tr	Alelos Transmitidos

Resumo

A Perturbação da Hiperactividade e Défice de Atenção (PHDA) é uma doença neuropsiquiátrica que se estima afectar 8% a 12% das crianças a nível mundial e está relacionada com o aumento do risco de dificuldades na aprendizagem, abuso/dependência do álcool e perturbações de personalidade anti-social. Vários estudos efectuados a nível mundial têm associado genes do complexo *SNARE* à PHDA, particularmente o gene *SNAP-25*. Contudo, não existe nenhum estudo efectuado relativamente ao gene *SNAP-25* na população portuguesa. Assim, no sentido de se investigar uma eventual associação entre o polimorfismo T1069C no gene *SNAP-25* e a PHDA na população portuguesa, procedeu-se à recolha de amostras de probandos e seus progenitores (trios). A genotipagem foi efectuada por PCR-RFLP e os dados obtidos foram analisados segundo as estratégias do HRR e TDT e os resultados revelaram uma tendência de associação entre o polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25* e a PHDA (HRR: $\chi^2=3,50$; d.f =1; p=0,061; TDT: $\chi^2=3,75$; d.f =1, p=0,053).

Assim, a estratégia de associação com base em trios e métodos HRR e TDT, que revelaram uma tendência de associação entre o alelo T do polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25* e a PHDA, parece sugerir que o polimorfismo estudado poderá desempenhar um papel directo na etiologia da PHDA na população portuguesa. Será importante o uso de uma amostra maior, bem como a análise de haplotipos, a fim de esclarecer uma eventual associação entre o gene *SNAP-25* e a PHDA na população portuguesa.

Palavras-chave: PHDA; Genética; *SNARE*; Gene *SNAP-25*; *HRR*; *TDT*.

Abstract

Attention Deficit and Hyperactivity Disorder (ADHD) is a neuropsychiatric disorder that affects 8% to 12% of children worldwide and is associated with increased risk of learning difficulties, alcohol abuse/dependence and antisocial personality disorders.

Several studies worldwide have associated the ADHD genes with the SNARE complex, particularly the *SNAP-25* gene. However, there is no study carried out for the *SNAP-25* gene in the Portuguese population. In order to investigate a possible association between the T1069C polymorphism in the *SNAP-25* gene and the ADHD in the Portuguese population, it was proceeded to a sample collection of probands and their parents (trios). Genotyping was performed by PCR–RFLP and the resulting data were analyzed according to HRR and TDT strategies. The results showed a trend of association between the T1069C polymorphism of *SNAP-25* gene and ADHD (HRR: $\chi^2=3, 50$; d.f =1; p=0,061; TDT: $\chi^2=3, 75$; d.f =1, p=0,053).

Thus, the association strategy based on trios and HRR and TDT methods, which revealed a trend of association between the T allele of the T1069C polymorphism of *SNAP-25* gene and the ADHD, seems to suggest that the identified polymorphism may play a direct role in the etiology of ADHD, in the Portuguese population. It will be important to use a larger sample, as well as the analysis of haplotypes, to clarify a possible association between the *SNAP-25* gene and the ADHD, in the Portuguese population.

Keywords: ADHD; Genetics; SNAREs; SNAP-25 gene; HRR; TDT

Introdução

A Perturbação de Hiperactividade e Défice de Atenção (PHDA) é uma das doenças neuropsiquiátricas mais comuns na infância e adolescência¹, caracterizando-se por sintomas de falta de atenção, hiperactividade e impulsividade². A nível mundial, estima-se que a PHDA afecte entre 8% a 12% das crianças³, sendo os rapazes três a quatro vezes mais afectados que as raparigas⁴. De acordo com a DSM-IV-TR⁵, a PHDA é dividida em três subtipos: hiperativo-impulsivo, desatento e misto. Crianças com PHDA têm um risco acrescido para desenvolver perturbações de ansiedade⁶ e anti-social⁷, dificuldades na aprendizagem, abuso/dependência do álcool e tabaco e mau relacionamento social e familiar³.

Vários estudos de imagiologia cerebral revelaram que, na PHDA, as principais áreas cerebrais afectadas são os córtices pré-frontal dorsolateral e cingulado anterior, o estriado dorsal, o cerebelo e o tálamo. Nestas estruturas o volume e/ou função estão habitualmente diminuídos, o que implica alterações na vigília, *working-memory*, capacidade de inibir uma resposta e, em menor grau, no estado de alerta, flexibilidade cognitiva e capacidade de planeamento⁸.

Segundo estudos familiares de gémeos e de adopção, a PHDA possui uma componente hereditária estimada em cerca de 75% a 91%³. Vários estudos efectuados a nível mundial revelam que os genes *DRD4*, *DRD5*, *HTR1B*, *DAT* e *SNAP-25* estão associados à PHDA¹. Na população portuguesa não são conhecidos os factores genéticos envolvidos na etiologia da PHDA, pelo que é imperativo fazer investigação neste âmbito, o que permitirá fazer diagnósticos mais rigorosos e adoptar medidas preventivas que reduzam o impacto da PHDA na vida destas crianças. Particularmente importante, a proteína *Synaptosomal-Associated Protein of 25 kDa* (SNAP-25) é constituinte do complexo *N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor* (SNARE), composto igualmente pelas proteínas *Syntaxin 1a* e *Vesicle-associated Protein Synaptobrevin 2* (VAMP-2) (Figura 1.). O gene *SNAP-25* localiza-

se no cromossoma 20p11.2¹⁰ e codifica uma proteína que, para além da sua função na exocitose, está envolvida também no crescimento axonal e na plasticidade sináptica⁹, existindo em elevadas concentrações nos neurónios do neocortex, hipocampo, córtex piriforme, núcleo talâmico anterior, núcleos pontinos e células granulares do cerebelo¹¹. O processo de transporte e libertação de neurotransmissores implicados na etiologia da PHDA, para a fenda sináptica é mediado por Ca^{2+} através da ligação entre o complexo SNARE e a proteína *Synaptotagmin*¹². De facto, estudos efectuados em ratos *Coloboma*, que têm a particularidade de ser hemizigóticos para o gene *SNAP-25*¹³, revelam que, entre os 11 e os 14 dias de vida, os ratos exibem sinais de impulsividade, inatenção^{14, 15} e hiperatividade^{13, 16}, sintomas característicos da doença. Ao realizar a inclusão transgénica de *SNAP-25*, para além da reposição dos níveis de dopamina¹⁷, cujos níveis se encontram diminuídos em ratos *Coloboma*, verificou-se a ausência de hiperactividade, mantendo-se os restantes sintomas¹⁸.

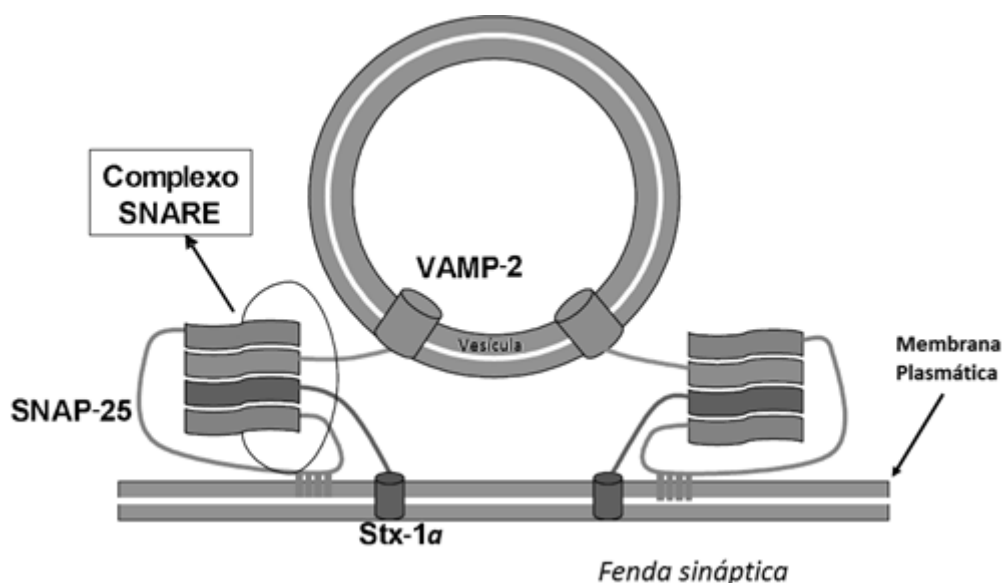


Figura 1. Modelo esquemático do complexo SNARE¹⁸.

A nível mundial, os estudos genéticos em humanos, relacionados com o gene *SNAP-25* e a PHDA, são maioritariamente positivos, quer para polimorfismos individuais quer para haplotipos de variantes genéticas^{1,20-28}. Particularmente importante, uma variação no DNA do

gene *SNAP-25* que confere risco para a PHDA está associada a uma expressão reduzida no córtex pré-frontal que é crítica para a regulação da atenção e inibição²⁸.

Face às evidências expostas, e uma vez que não existem estudos genéticos na população portuguesa, este trabalho tem por objectivo investigar uma possível associação entre o polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25* e a PHDA, numa amostra de trios.

Materiais e métodos

1. Selecção da amostra

Neste estudo, trios completos da população portuguesa com probandos com PHDA, num total de 63 trios, foram seleccionados na Consulta de Hiperactividade do Centro de Desenvolvimento da Criança do Hospital Pediátrico de Coimbra. Os critérios de inclusão consistem em crianças acima de 6 anos de idade, com QI superior ou igual a 80 e diagnosticadas com PHDA, que satisfizeram os critérios da DSM-IV-TR⁵ em pelo menos dois contextos e avaliadas por um mínimo de dois avaliadores independentes. Todos os três subtipos da doença (desatento, hiperactivo-impulsivo e misto) foram incluídos no estudo. Os critérios para PHDA, a inteligência normal e as comorbilidades são avaliados a partir de entrevistas estruturadas com base nos critérios da DSM-IV-TR⁵ de PHDA, de Wechsler Intelligence Scale for Children, versão 3 (WISC III), de questionários comportamentais para pais e professores e relatório que incluiu *Conners* para pais e professores e questionários Child Behavior Checklist e Kiddie-SADS-PL. Todas as crianças foram submetidas a testes com vista a rejeitar crianças com desatenção e/ou hiperactividade-impulsividade secundárias a outras condições médicas, nomeadamente crianças com antecedentes de lesões cerebrais traumáticas significativas, epilepsia, tumor cerebral, entre outros. Crianças com problemas do

foro psiquiátrico, do neurodesenvolvimento ou com outros factores que poderiam interferir significativamente com as habilidades de atenção, foram eliminadas.

O projecto foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e as amostras foram recolhidas após consentimento informado por escrito dos pais das crianças com PHDA. Para o desenvolvimento do estudo, colheram-se 10 mL de sangue periférico das crianças e dos respectivos pais, tendo essas amostras sido colocadas em tubos de vácuo (Vacuteiner®) contendo anti-coagulante EDTA.

2. Genotipagem

2.1.Extracção do DNA

Procedeu-se posteriormente à extracção do DNA dos leucócitos, segundo o método enzimático adaptado de Miller *et al.* (1988)²⁹.

2.2.Avaliação do grau de pureza e quantificação do DNA

Ao DNA extraído de cada amostra foi adicionada água para obtenção da diluição de 25x, sendo essas soluções sujeitas a vórtex e colocadas individualmente em cuvette de quartzo no espectrofotómetro (*SmartSpec™ Plus Spectrophotometer*, BioRad®), no qual se efectuou a leitura das densidades ópticas (DO) a 260 nm (DNA) e a 280 nm (proteínas). Valores do quociente DO260/DO280 situados entre 1,5 e 2, indicam alto grau de pureza. A quantificação do DNA foi obtida através da equação $[\text{DNA}] (\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}) = \text{DO}_{260} \times \text{factor de diluição} \times \text{constante da dupla hélice}$.

2.3. Reacção em cadeia da polimerase

Para o estudo do polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25*, o DNA foi amplificado com recurso a um termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems), através do método PCR-RFLP, segundo condições optimizadas do protocolo de Barr *et al.* (2000)²⁰. A pré- desnaturação de 125 ng de DNA genómico decorreu durante 5 minutos a 95° C. Para um volume final de 25 µL, a cada amostra de DNA desnaturado foram adicionados *buffer* 1X (Invitrogen ®), MgCl₂ 1,5 mM, dNTP's 160 µM (Invitrogen ®), primers 1,6 ng/ µL (Invitrogen ®) e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen), sendo submetidos a ciclos de 30 seg a 94°C (desnaturação), 40 seg a 61°C (*annealing*) e 30 seg a 72°C (extensão), num total de 35 ciclos.

2.4. Digestão com enzima de restrição

O produto final da amplificação por PCR foi seguidamente incubado com a enzima Dde I (New England Biolabs®) a 37 °C *overnight*. Da digestão pela enzima de restrição resultam fragmentos de 228 pb + 33 pb para o alelo mutante e um fragmento de 261 pb para o alelo selvagem.

2.5. Electroforese em gel de agarose

Aos produtos de digestão com a enzima de restrição foi adicionado o corante que contém azul de bromofenol 0,025% (m/V) (Sigma®), xileno cianol 0,025% (m/V) e glicerol a 30 % (m/V) e foram colocados nos poços do gel de agarose a 2,5 %. A electroforese decorreu em tampão TBE 1X (Tris-base 89 mM; ácido bórico 89 mM; Na₂EDTA.2H₂O 2 mM, pH = 8) e foi sujeita a uma voltagem de 90 V. Seguidamente, o gel foi retirado do suporte e visualizado no Gel Doc (Bio-Rad®) para observação das bandas de DNA.

3. Análise estatística

Neste estudo, foram incluídos trios completos constituídos pelo probando e os seus progenitores e foram analisados utilizando as estratégias do *Haplotype Relative Risk* (HRR)³⁰ e do *Transmission Disequilibrium Test* (TDT-STDT) (v1.1)³¹. A estratégia do HRR utiliza progenitores homozigóticos e heterozigóticos, enquanto o TDT utiliza somente progenitores heterozigóticos. Com o HRR e o TDT são determinados os alelos transmitidos (Tr) e os alelos não transmitidos (NTr), sendo que os alelos não transmitidos funcionam como controlos.

Resultados e Discussão

Para o estudo do polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25* localizado na região 3' *UTR*, o DNA foi amplificado por PCR e um fragmento de 261 pb foi obtido. Este foi digerido com a enzima de restrição DdeI e após análise do perfil electroforético, foram identificadas amostras com apenas uma banda de 261 pb, que correspondem a indivíduos homozigóticos para o alelo T, amostras com bandas de 261 pb e 228 pb, que correspondem a indivíduos heterozigóticos TC e amostras com uma banda de 228 pb que correspondem a indivíduos homozigóticos para o alelo C (Figura 2.). De referir que os fragmentos de 33 pb resultantes da digestão do alelo mutante não foram visualizadas devido à concentração do gel utilizado.

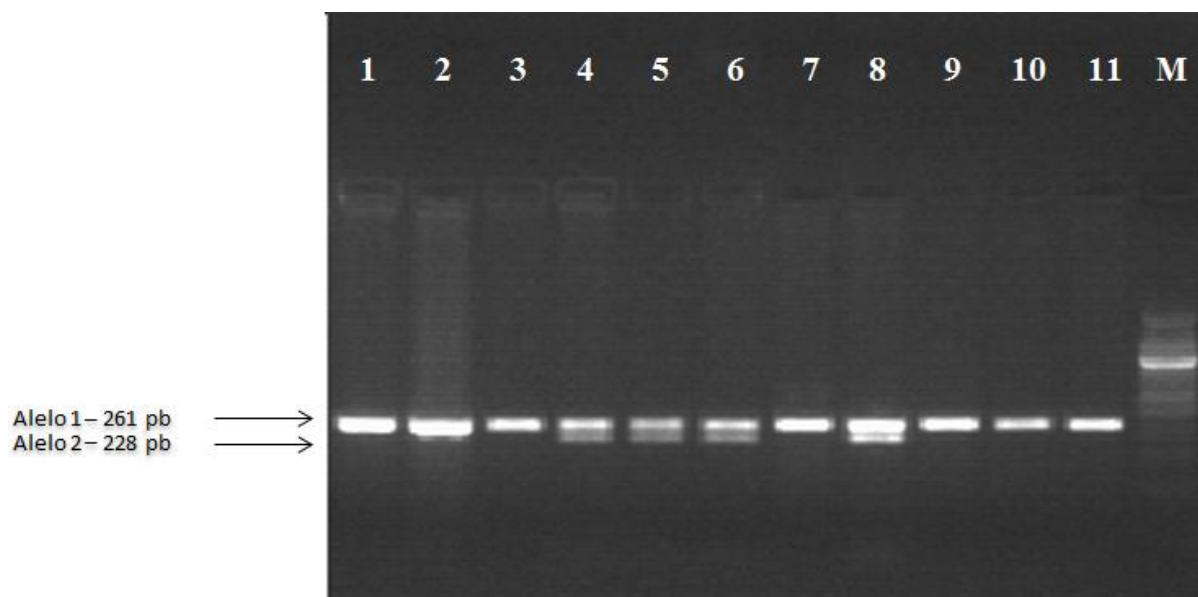


Figura 2. Exemplo de perfil electroforético obtido após digestão pela enzima de restrição **DdeI** e gel de agarose a 2,5%. Legenda: 1, 2, 3, 7, 9, 10, 11 - indivíduos homozigóticos selvagens (genótipo TT); 4,5,6 e 8 - indivíduos heterozigóticos (genótipo TC); M – marcador de peso molecular de 100 pb.

Como mencionado anteriormente, a estratégia do HRR utiliza progenitores homozigóticos e heterozigóticos e são determinados os alelos transmitidos (Tr) e os alelos não transmitidos (NTr) e, os alelos NTr funcionam como controlos. Para o HRR, os resultados obtidos do polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25* estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. *Haplotype Relative Risk* do polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25* em trios com probandos com PHDA

		Gene <i>SNAP-25</i>			
		Tr	NTr	Total	χ^2 (d.f=1); p
HRR	Alelo T	100	87	187	$\chi^2=3,50$; p=0,061
	Alelo C	26	39	65	
	Total	126	126	252	

A análise dos resultados pelo método HRR revelou uma tendência de associação entre o polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25* e a PHDA ($\chi^2=3,50$; d.f=1; p=0,061).

Como descrito na metodologia, o método TDT utiliza somente progenitores heterozigóticos e à semelhança do HRR são também determinados os alelos transmitidos (Tr) e os alelos não transmitidos (NTr) e, os resultados obtidos representados na Tabela 2. mostram também uma tendência de associação e *linkage disequilibrium* entre o polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25* e a PHDA ($\chi^2=3,75$; d.f=1, p=0,053).

Tabela 2. *Transmission Disequilibrium Test* do polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25* em trios com probandos com PHDA

		Gene <i>SNAP-25</i>			χ^2 (d.f=1); p
		Tr	NTr	Total	
HRR	Alelo T	26	19	45	$\chi^2=3,75$; p=0,053
	Alelo C	19	26	45	
	Total	45	45	90	

Os resultados obtidos de ambas as estratégias (HRR e TDT) sugerem uma ligeira tendência de associação entre o alelo T do polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25* e a PHDA na população portuguesa, resultado que se assemelha ao estudo realizado por Brophy *et al.* (2002)³² numa amostra de 93 trios da população irlandesa. Nesse estudo foi reportado um aumento de transmissão estatisticamente significativo do alelo T do polimorfismo T1069C em crianças com PHDA ($\chi^2=6,48$; d.f=1; p=0,01). Barr e colaboradores (2000)²⁰ demonstraram igualmente uma tendência para associação entre o polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25* e a PHDA, numa amostra maioritariamente composta por caucasianos de

descendência europeia ($\chi^2=3,20$; d.f=1; $p=0,07$), apesar de ser maioritariamente transmitido o alelo C.

No entanto, outros estudos semelhantes realizados não revelaram diferenças estatisticamente significativas entre os alelos transmitidos e os não transmitidos dos progenitores às crianças com PHDA, em relação aos alelos do polimorfismo T1069C do gene SNAP-25 individualmente. São exemplos os estudos de Kustanovich *et al.* (2003)³³ em famílias de caucasianos da população americana (TDT: $p=0,42$), Mill *et al.* (2004)²² (TDT: $\chi^2=1,95$, $p=0,16$; HHRR: $\chi^2=1,56$, $p=0,21$), Feng *et al.* (2005)²³ em famílias de caucasianos da população americana (TDT: $\chi^2=1,14$, $p=0,29$) e em famílias da população canadiana (TDT: $\chi^2=0,07$, $p=0,93$) e Sarkar *et al.* (2012)²⁷ numa amostra da população indiana (TDT: $\chi^2=1,8$, $p=0,18$). Em contrapartida, alguns destes estudos obtiveram resultados diferentes ao usar haplotipos de polimorfismos do gene SNAP-25, incluindo os polimorfismos T1069C e T1065G. Por exemplo, no estudo realizado por Barr *et al.* (2000)²⁰ foi obtida associação entre o haplotipo TC (formado pelo alelo C do polimorfismo T1069C e o alelo T do polimorfismo T1065) e a PHDA (TDT: $\chi^2=4,74$, $p=0,03$) e uma tendência de associação entre a PHDA e o haplotipo TT (formado pelo alelo T do polimorfismo T1069C e o alelo T do polimorfismo T1065G) (TDT: $\chi^2=3,66$, $p=0,056$). Resultados semelhantes foram reportados no estudo de Kustanovich *et al.* (2003)³⁴, no qual uma tendência de associação entre o haplotipo GT do gene SNAP-25 e a PHDA (TDT: $p=0,06$) foi observada. Particularmente, o estudo realizado por Sarkar e colaboradores (2012)²⁷ revelou uma associação ($p<0,05$) entre a PHDA e 9 haplotipos diferentes do gene SNAP-25, dos quais 7 contêm o polimorfismo T1069C.

Face ao exposto, vários factores poderão estar implicados na discrepância de resultados obtidos nas diferentes populações estudadas. O tamanho da amostra e os critérios de selecção da mesma, poderão contribuir para a inconsistência dos resultados obtidos em diferentes populações mundiais. Além disso, determinados tipos de polimorfismos poderão

estar implicados de forma diferente nos subtipos de PHDA, como sugere o trabalho realizado por Zhang *et al.* (2011)²⁶, sendo um aspecto a ter em consideração face à heterogeneidade clínica e genética desta doença. Por outro lado, os estudos de Brophy *et al.* (2002)³² e Kustanovich *et al.* (2003)³³ apontam para que a associação da PHDA ao gene *SNAP-25* dependa do progenitor que transmita o alelo ao probando.

Será igualmente fundamental, para esclarecer a relação entre o gene *SNAP-25* e a PHDA na população portuguesa, ter em consideração outras variantes genéticas do gene, permitindo desta forma a análise de haplotipos^{20,21,24,26,33}, bem como o estudo de outros genes candidatos do complexo SNARE, nomeadamente o gene da syntaxina 1A.

Conclusão

Utilizando a estratégia do HRR e TDT, os resultados obtidos na população portuguesa revelam uma tendência de associação ou *linkage disequilibrium* entre o polimorfismo T1069C do gene *SNAP-25* e a PHDA. No sentido de esclarecer os resultados obtidos na PHDA, está em curso o estudo de outros polimorfismos no gene *SNAP-25*, particularmente o polimorfismo T1065G e o uso de uma amostra maior, que permitirão efectuar a análise de haplotipos e realizar estudos de associação entre o gene *SNAP-25* e os diferentes subtipos de PHDA, nomeadamente inatento, hiperactivo-impulsivo e misto, na população portuguesa.

Agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Alda Cardoso, responsável pela Unidade de Genética Clínica a Molecular da Delegação Centro do INMLCF e tutora desta Tese de Mestrado, por todo o apoio dado e total disponibilidade demonstrada ao longo da elaboração deste Trabalho

Final. Saliento o rigor, conhecimento, amizade e sentido de responsabilidade que sempre me transmitiu.

Agradeço ao Centro de Desenvolvimento da Criança do Hospital Pediátrico de Coimbra, particularmente ao Dr José Boavida Fernandes e respetiva equipa, bem como às crianças e seus pais que aceitaram colaborar neste estudo.

Agradeço em especial à Márcia Barros do laboratório da Unidade de Genética Clínica e Molecular do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses que me ajudou na execução das diversas técnicas laboratoriais.

Agradeço igualmente ao meu colega Luís Falcão, que me acompanhou ao longo de todas as etapas da preparação da minha Tese de Mestrado, pela ajuda e amizade.

Por fim, um agradecimento especial aos meus pais, à minha irmã e à Mariana, cujo apoio e força transmitidos foram de importância ímpar. Saliento o enorme esforço realizado a fim de me proporcionarem todas as condições para a conclusão do meu curso de Medicina, um Gesto para mim inolvidável.

Referências bibliográficas

- ¹Faraone, S. and Mick, E., Molecular Genetics of Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Psychiatr Clin North Am.* 2010; 33(1): 159–180.
- ²Faraone, S., Biederman, J., Spencer, T., et al., Attention-deficit/hyperactivity disorder in adults: an overview. *Biol Psychiatry.* 2000; 48: 9–20.
- ³Corradini, I., Verderio, C., Salaa, M., et al., SNAP-25 in neuropsychiatric disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1152: 93–99.
- ⁴Martel, M., Klump, K., Nigg, J., et al., Potential hormonal mechanisms of attention-deficit/hyperactivity disorder and major depressive disorder: a new perspective. *Horm Behav.* 2009; 55(4):465–79.
- ⁵APA: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Fourth, Text Revision edn. Washington 2000.
- ⁶Biederman, J., Newcorn, J. and Sprich, S., Comorbidity of attention deficit hyperactivity disorder with conduct, depressive, anxiety, and other disorders. *Am J Psychiatry.* 1991; 151:1673–1685.
- ⁷Semiz, U., Basoglu, C., Oner, O., et al., Effects of diagnostic comorbidity and dimensional symptoms of attention-deficit-hyperactivity disorder in men with antisocial personality disorder. *Aust N Z J Psychiatry.* 2008; 42:405–413.
- ⁸Aguiar, A., Eubig, P. A., e Schantz, S. L., Attention Deficit/Hyperactivity Disorder: A Focused Overview for Children's Environmental Health Researchers. *Environmental Health Perspectives.* 2010; 118 (12):1646-1653.
- ⁹Fan, H., Fan, F., Bao, L., et al. SNAP-25/Syntaxin 1a complex functionally modulates neurotransmitter GABA reuptake. *J Biol Chem.* 2006; 281(38):28174-84.
- ¹⁰Maglott, D., Feldblyum, T., Durkin, A., et al., Radiationhybrids mapping of SNAP, PCSK2 and THBD (human chromosome 20p). *Mamm Genome.* 1996; 7: 400–401.

- ¹¹Oyler, G., Higgins, G., Hart, R., et al., The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J Cell Biol.* 1989; 109:3039–3052.
- ¹²Sollner, T., Whiteheart S., Brunner, M., et al., SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature.* 1993; 362:318–324.
- ¹³Hess, E.J., Jinnah, H. A., Kozak, C. A., et al., Spontaneous locomotor hiperactivity in a mouse mutant with a deletion including the SNAP gene on chromossome 2. *J. Neurosci.* 1992; 12: 2865-2874.
- ¹⁴Wilson, M., Coloboma mouse mutant as an animal model of hyperkinesis and attention deficit hyperactivity disorder. *Neurosci Biobehav Rev.* 2000; 24: 51–57.
- ¹⁵Bruno, K., Freet, C., Twining, R., Abnormal latent inhibition and impulsivity in coloboma mice, a model of ADHD. *Neurobiol Dis.* 2007; 25: 206–216.
- ¹⁶Searle, A., New mutants, Vo12, Coloboma. *Mouse News Lett*, 1966; 35:27. Shaywitz
- ¹⁷Steffensen, S., Henriksen, S. and Wilson, M., Transgenic rescue of SNAP-25 restores dopamine-modulated synaptic transmission in the coloboma mutant. *Brain Res.* 1999; 847: 186–195.
- ¹⁸Hess, E. J., Collins, K. A., Wilson, M. C., et al., Mouse model of hiperkinesis implicates SNAP-25 in behavioral regulation. *J Neurosci.* 1996; 16:3104-3111.
- ¹⁹Kovács-Nagi, R., Hu, J., Rónai, Z., et al., SNAP-25: a novel candidate gene ins psychiatric genetics. *Neuropsychopharmacologia Hungarica.* 2009; XI/2, 89-94.
- ²⁰Barr, C. L., Feng, Y., Wigg, K., et al., Identification of DNA variants in the SNAP-25 gene and linkage study of the polymorphisms and attention-deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry.* 2000; 5: 405-409.
- ²¹Mill, J., Curran, S., Kent, L., et al., Association Study of a Snap-25 Microsattelite and Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Am J Med Genet.* 2002, 114: 69-271.

- ²²Mill, J., Richards, S., Knight, J., et al., Haplotype analysis of SNAP-25 suggests a role in the aetiology of ADHD. *Mol Psychiatry*. 2004; 9: 801–810.
- ²³Feng, Y., Crosbie, J., Wigg, K., et al., The SNAP25 gene as a susceptibility gene contributing to attention-deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*. 2005; 10: 998–1005.
- ²⁴Choi, T., Lee, H., Kim, J., et al., Support for the MnlI polymorphism of SNAP25; a Korean ADHD case–control Study. *Mol Psychiatry*. 2007; 12: 224–226.
- ²⁵Öner, O., Akın, A., Herken, H., et al., Association Among SNAP-25 Gene DdeI and MnlI Polymorphisms and Hemodynamic Changes During Methylphenidate Use: A Functional Near-Infrared Spectroscopy Study. *J Atten Disord*. 2011; 15(8): 628–637.
- ²⁶Zhang, H., Zhu, S., Zhu, Y., et al., An association study between SNAP-25 gene and Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. *Eur J Pediatric Neurology*. 2011; 15: 48-52.
- ²⁷Sarkar, K., Bhaduri, N., Ghosh, P., et al., Role of SNAP25 Explored in Eastern Indian Attention Deficit Hyperactivity Disorder Probands, *Neurochem Res*. 2012; 37: 349–357.
- ²⁸Hawi, Z., Matthews, N., Wagner, J., et al., DNA Variation in the SNAP25 Gene Confers Risk to ADHD and Is Associated with Reduced Expression in Prefrontal Cortex. *PLOS ONE* (www.plosone.org), 2013, 8(4): e60274; 1-4.
- ²⁹Miller, S., Dykes, D., Polesky, H., et al., A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16:1215.
- ³⁰Terwilliger, J. and Ott, J., A haplotype-based 'haplotype relative risk' approach to detecting allelic associations. *Hum Hered*. 1992; 42(6):337-46.
- ³¹Spielman, R., McGinnis, R. and Ewens, W., Transmission Test for Linkage Disequilibrium: The Insulin Gene Region and Insulin-dependent Diabetes Mellitus (IDDM), *Am J Hum Genet*. 1993; 52(3): 506–516.

- ³²Brophy, K., Hawi, Z., Kirley, A., Fitzgerald, M., et al., Synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): evidence of linkage and association in the Irish population. *Mol Psychiatry*. 2002; 7: 913-917.
- ³³Kustanovich, V., Merriman, B., McCough, J., et al., Based paternal transmission of SNAP-25 risk alleles in attention-deficit hiperactivity disorder. *Mol Psychiatry*. 2003; 8: 309-315.